

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/533, 33/58	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/26287 (43) Date de publication internationale: 18 juin 1998 (18.06.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/02288 (22) Date de dépôt international: 12 décembre 1997 (12.12.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/15261 12 décembre 1996 (12.12.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CIS BIO INTERNATIONAL [FR/FR]; RN 306, F-91400 Saclay (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): ASPE, Daniel [FR/FR]; Rue Ferdinand Buisson, F-30290 Laudun (FR). (74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: NON-AGGREGATED FLUORESCENT CONJUGATES AND METHOD FOR OBTAINING THEM (54) Titre: CONJUGUES FLUORESCENTS NON AGREGES ET LEUR PROCEDE D'OBTENTION (57) Abstract <p>The invention concerns a method for obtaining a fluorescent conjugate between a carrier molecule having at least an amino, hydroxy, carboxy and/or sulphhydryl group and a fluorophore reagent having at least a functional group capable of reacting with said amino, hydroxy, carboxy and/or sulphhydryl group(s), which consists in bringing said molecule and said fluorophore reagent in the presence of an aqueous solution of a water-soluble macrocycle. The invention also concerns the conjugates obtained by this method and their use.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne un procédé d'obtention d'un conjugué fluorescent entre une molécule porteuse possédant au moins un groupement amino, hydroxy, carboxy et/ou sulfhydryl et un réactif fluorophore possédant au moins un groupement fonctionnel susceptible de réagir avec le(s)dit(s) groupe(s) amino, hydroxy, carboxy et/ou sulfhydryl, qui consiste à mettre en présence ladite molécule porteuse et ledit réactif fluorophore avec une solution aqueuse d'un macrocycle soluble dans l'eau. L'invention concerne également les conjugués obtenus par ce procédé et leur utilisation.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Conjugués fluorescents non agrégés et leur procédé d'obtention

L'invention concerne un procédé de fabrication de conjugués fluorescents non agrégés. L'invention concerne également les conjugués fluorescents non agrégés obtenus par ce procédé et leur utilisation comme traceurs fluorescents.

5 L'autoagrégation de colorants hydrophobes tels que la thionine ou le bleu de méthylène, est bien connue en solution aqueuse à haute concentration, comme décrit dans J. Am. Chem. Soc. 63,69 (1941). Ces agrégats entraînent un changement de spectre d'absorption et une réduction de la fluorescence desdits colorants.

10 Les cyanines sont également connues pour s'agréger en provoquant un quenching de fluorescence (J. Phys. Chem. 69, 1894 (1965)).

Ce phénomène d'agrégation est notamment amplifié dans la fabrication de conjugués fluorescents. Waggoner et al. ont ainsi observé un phénomène d'agrégation après conjugaison de cyanine isothiocyanate sur un anticorps
15 (Cytométrie 10:11-19 (1989)). Ces mêmes auteurs décrivent des cyanines arylsulfonates présentant la particularité de se coupler par voie N-hydroxysuccinimide et de s'agréger faiblement sur conjugués protéiques, propriété qu'ils attribuent à la présence de groupements sulfonates sur le noyau cyanine (brevet US 5 268 486), ainsi que des cyanines à base de
20 naphthalènesulfonate (Bioconjugate Chemistry 7 : 356-362 (1996)). Dans ce dernier article, les auteurs montrent l'importance du nombre de sulfonates dans les processus de désagrégation.

Cependant, il a été rapporté que la fluorescence d'un conjugué entre une cyanine désignée par CY5.18 issue du brevet US 5 268 486 et un anticorps anti-
25 HCG (rapport molaire = 1,7) est quenchée par rapport à celle de la cyanine libre (Anal. Biochem. 217 : 197-204 (1994)).

D'autre part, la Demanderesse a réalisé des essais sur des anticorps anti-cancer prostatique et anti-hormone spécifique de la thyroïde marqués avec les composés CY5.18 et CY5.29 issus du même brevet US 5 268 486 (exemples 1 et
30 2). Ces exemples montrent un fort quenching des cyanines quelque soit le taux de marquage final.

Enfin, dans le même brevet US 5 268 486, les auteurs soulignent l'importance des cyanines comme remplaçant potentiel des phycobiliprotéines et mettent en avant les avantages suivants :

- 35 -stabilité
-cout moindre

-procédure de marquage simplifiée

-taille adaptée à la reconnaissance de petites molécules.

Ces avantages deviennent toutefois inopérants quand les cyanines se retrouvent agrégées sur les conjugués.

5 La demande WO 96/00902 propose, pour pallier l'inconvénient de l'agrégation des cyanines, d'introduire des groupements iminium dans leur structure. Toutefois, cette demande se contente d'apprécier la capacité désagrégeante de structures qui y sont décrites en comparant les spectres UV dans des solutions salines faiblement et fortement concentrées, et ne donne aucun
10 résultat sur les conjugués.

Parallèlement, l'augmentation de fluorescence provoquée par l'ajout de cyclodextrine dans un milieu contenant un fluorophore est décrite dans la littérature (J. Chromatog. 452 (1988) ; Macromolecules 10(3) : 676-681 (mai-juin 1977)).

15 Inversement, certaines molécules fluorescentes sont quenchées par l'addition de cyclodextrines (Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry 18 : 385-396 (1994), Kluwer Academic Publishes).

20 La formation de complexes d'inclusion cyanine-cyclodextrine est décrite en littérature (J. Am. Chem. Soc. 112 : 5824-5830 (1990)). Selon les conditions et la nature de la cyclodextrine, on peut voir des complexes monomériques ou dimériques, lesquels favorisent l'agrégation des cyanines et donc le quenching de fluorescence desdites cyanines.

Pour conserver les propriétés fluorescentes des complexes d'inclusion, l'art antérieur décrit des liaisons covalentes faisant intervenir une fonction de la cyclodextrine (WO 91/02040).

25 La demande WO 91/01090 décrit des chélates d'Europium attachés de façon covalente à une cyclodextrine, qui est ensuite couplée à une protéine.

Toutefois, ce type de liaison est difficile à réaliser, notamment parce qu'elle nécessite la modification chimique de la cyclodextrine (sous forme par exemple de N-hydroxysuccinimide, maléimide, thiol ou amine) et présente l'inconvénient :

30 - d'altérer les propriétés des complexes d'inclusion et donc de diminuer les performances de fluorescence ;

- d'altérer les propriétés de la protéine, par un marquage de la cyclodextrine sur des fonctions biodisponibles.

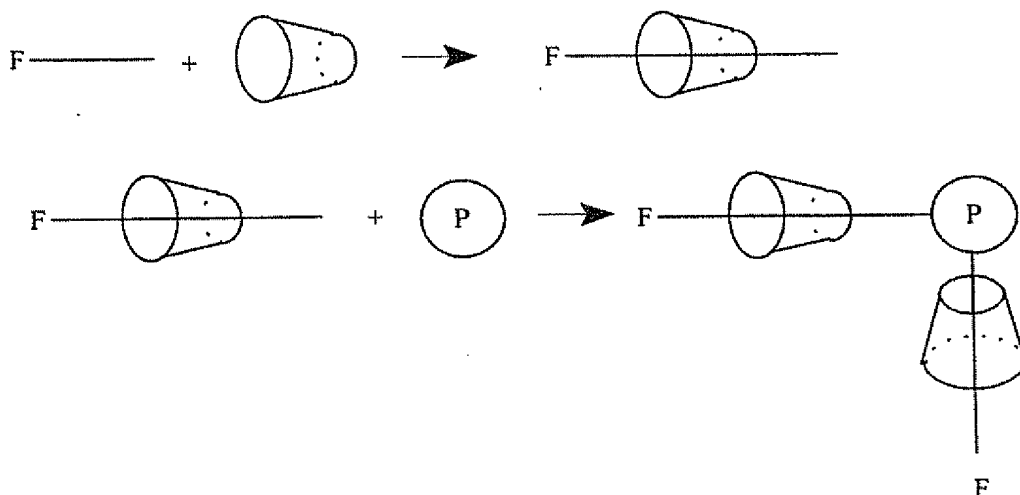
35 La présente invention se propose de remédier à ces inconvénients et de préserver les propriétés de conjugués entre une molécule porteuse et un réactif fluorophore.

Ainsi, un premier objet de l'invention consiste à obtenir un conjugué hautement fluorescent et non agrégé.

Un autre objet de l'invention consiste à obtenir un tel conjugué fluorescent de manière simple et rapide.

- 5 Ces objets sont atteints, selon un premier aspect de l'invention, par un procédé pour l'obtention d'un conjugué fluorescent entre une molécule porteuse possédant au moins un groupement amino, hydroxy, carboxy et/ou sulfhydryl et un réactif fluorophore possédant au moins un groupement fonctionnel susceptible de réagir avec le(s)dit(s) groupe(s) amino, hydroxy, carboxy et/ou sulfhydryl, qui
 10 consiste à mettre en présence ladite molécule porteuse et ledit réactif fluorophore avec une solution aqueuse d'un macrocycle soluble dans l'eau contenant de 1 à 40 % (m/v) dudit macrocycle.

Le mécanisme réactionnel peut être représenté par le schéma suivant :



15

où

F est le réactif fluorophore et

P est la molécule porteuse.

La molécule porteuse P réagit avec les fonctions du réactif fluorophore F.

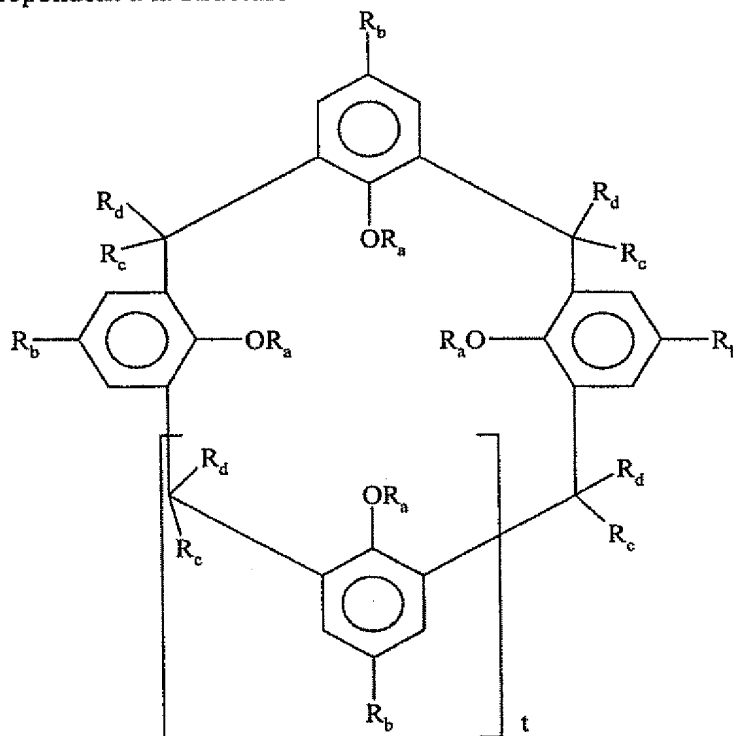
- 20 Cela a pour effet de conserver les distances intermoléculaires et d'éviter le rapprochement des réactifs fluorophores sur la molécule porteuse. La conséquence en est une diminution de l'agrégation des réactifs fluorophores.

Avantageusement, la concentration en macrocycle dans la solution aqueuse de macrocycle est comprise entre 10 et 40 % (m/v).

Comme macrocycle soluble dans l'eau, on utilisera avantageusement une cyclodextrine éventuellement substituée ou un calixarène substitué par des groupes hydrophiles.

On peut citer à titre d'exemple de cyclodextrine utilisable dans le procédé conforme à l'invention, l' α -cyclodextrine, la β -cyclodextrine, la γ -cyclodextrine, l'hydroxypropyl- α -cyclodextrine, l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine, l'hydroxypropyl- γ -cyclodextrine, l'hydroxyéthyl- α -cyclodextrine, l'hydroxyéthyl- β -cyclodextrine, l'hydroxyéthyl- γ -cyclodextrine ou la 2,6-di-O-méthyl-heptakis- β -cyclodextrine.

Les calixarènes qui peuvent être utilisés dans le procédé conforme à l'invention répondent à la structure



dans laquelle :

- R_a et R_b représentent chacun un groupement hydrophile choisi parmi H, $(CH_2)_pCO_2H$, $(CH_2)_pOH$, $(CH_2)_pNH_2$, $(CH_2)_pSO_3H$ ou $(CH_2)_pN^+R_cR_dR_e$;
- R_c , R_d et R_e représentent chacun l'hydrogène ou un (C_1-C_3) alkyle ;
- p varie de 0 à 4 pour R_b et de 1 à 4 pour R_a ; et
- t varie de 1 à 5.

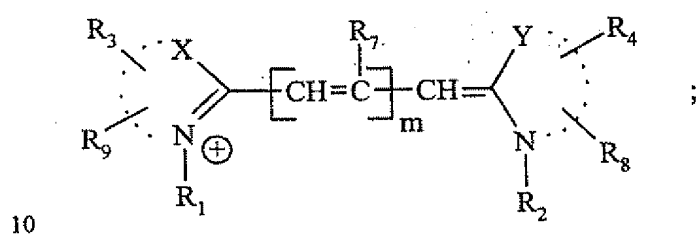
Le macrocycle soluble dans l'eau forme un complexe d'inclusion, soit avec le réactif fluorophore, soit avec la molécule porteuse et forme ainsi une structure

rotaxane stable. Ce complexe d'inclusion peut subsister dans la structure finale du conjugué fluorescent obtenu par le procédé conforme à l'invention.

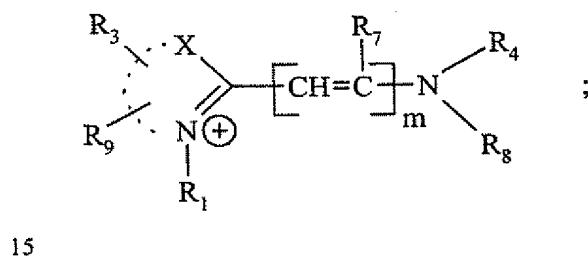
Généralement, le réactif fluorophore utilisé est un chromophore à un ou plusieurs noyaux aromatiques, ledit chromophore ayant un coefficient d'extinction moléculaire élevé, supérieur à 20 000, de préférence supérieur à 50 000.

Selon un aspect préféré de l'invention, ledit réactif fluorophore est choisi parmi

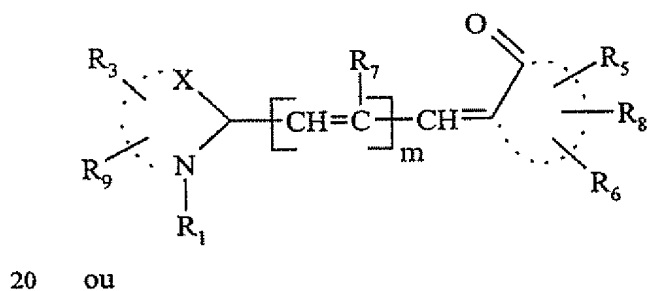
* une cyanine de structure

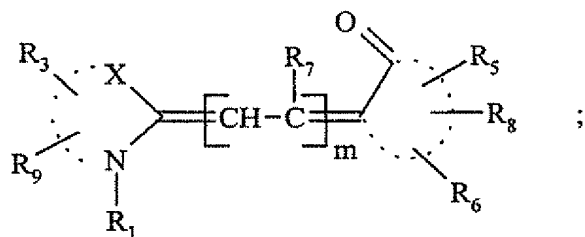


* une hémicyanine de structure

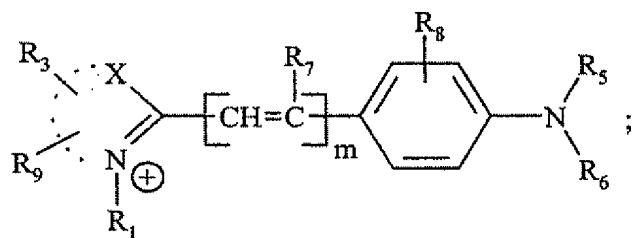


* une mérocyanine de structure



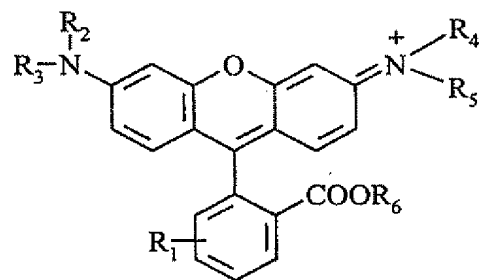


* un styryl de structure

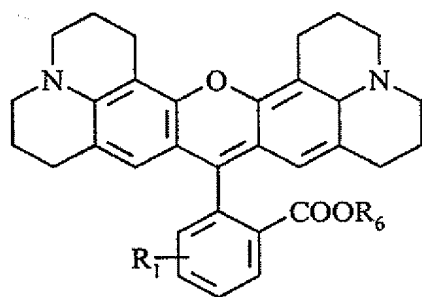


5

* une rhodamine de structure :



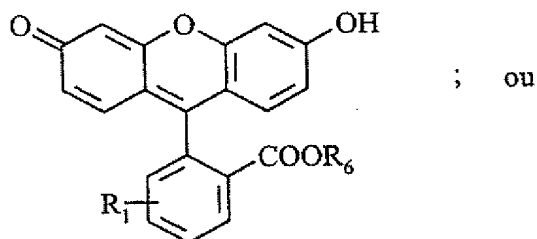
10 ou



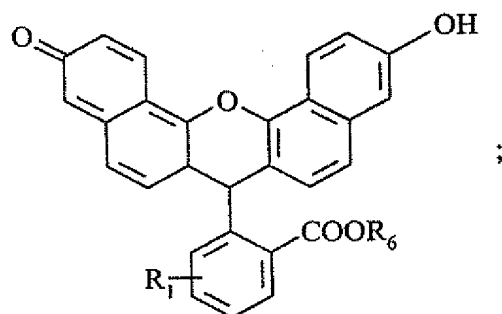
;

* une fluorescéine de structure :

7



* une naphtofluorescéine de structure :



5

dans lesquelles structures :

- les lignes en pointillé représentent chacune les atomes de carbone nécessaires pour former 1 à 3 cycles fusionnés, les groupes R₃, R₄, R₅, R₆, R₈ et R₉ étant attachés à ces cycles ;

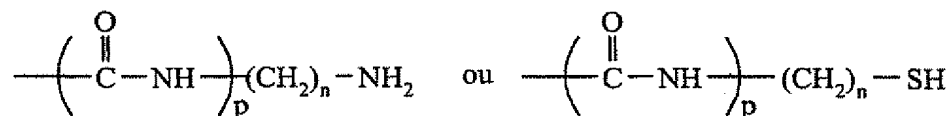
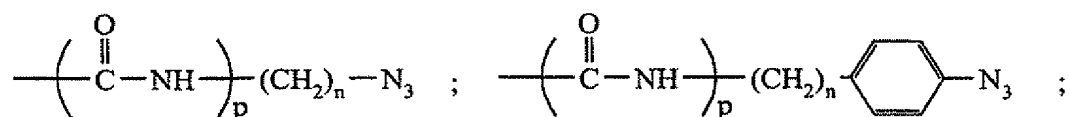
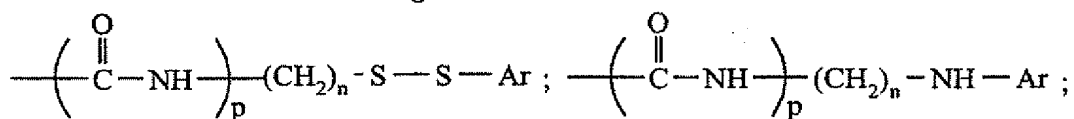
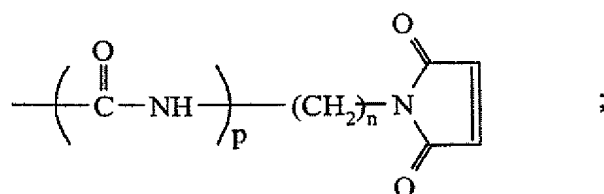
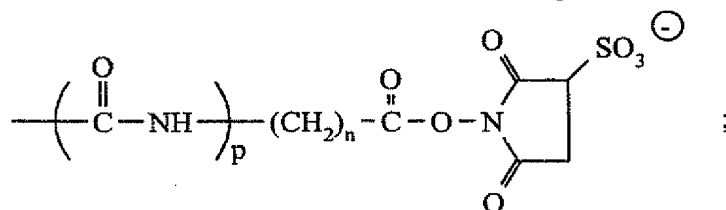
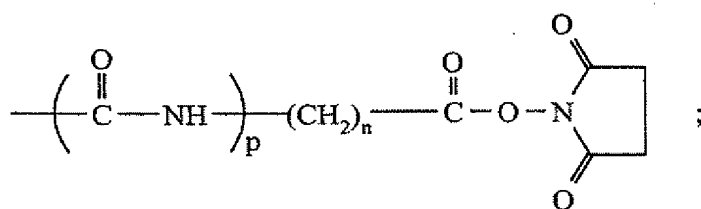
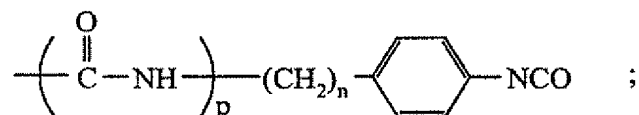
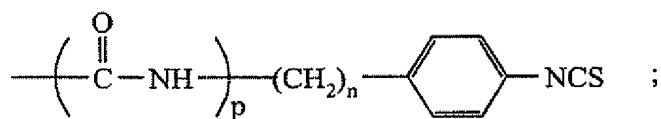
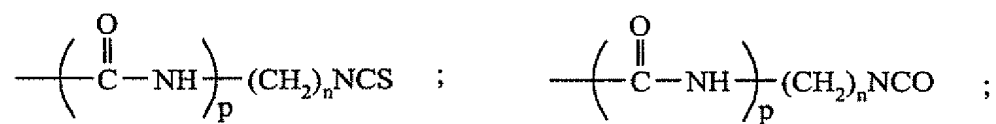
10

- X et Y représentent chacun N, $\text{C}=\text{O}$, O, S ou $\text{C}(\text{CH}_3)_2$;

- m vaut 1, 2, 3 ou 4 ;

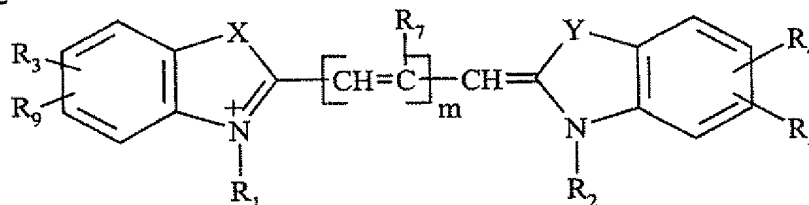
- au moins un des groupes R₁ à R₇ est capable de réagir avec un groupement amino, hydroxy, carboxy et/ou sulfhydryl et est choisi parmi

15



où n varie de 0 à 8 et p est égal à 0 ou 1, et Ar est un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons comprenant 1 à 3 hétéroatomes, éventuellement substitué par un atome d'halogène, ceux des groupes R_1 à R_7 ne représentant pas une des entités réactives ci-dessus étant choisis parmi l'hydrogène ou un groupe $-(CH_2)_r-Z$ dans lequel r varie de 0 à 4 et Z représente un groupe CH_3 , SO_3H , OH ou $N^+R_1R_2R_3$ dans lequel R_1 , R_2 et R_3 sont tels que définis ci-dessus, et au moins un des groupes R_8 et R_9 représente un groupe SO_3^- ou SO_3H , l'autre groupe représentant l'hydrogène ou un groupe SO_3^- ou SO_3H . De préférence, p est égal à 0 dans les formules ci-dessus.

10 Plus particulièrement, on utilisera de manière avantageuse une cyanine de structure



dans laquelle les groupes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_7 , R_8 et R_9 sont tels que définis précédemment.

15 Une classe de cyanines préférée est composée des cyanines ci-dessus dans lesquelles X et Y représentent chacun un groupe $C(CH_3)_2$.

Parmi ces cyanines, celles où

(i) R_1 et R_2 représentent chacun un groupe 5-(succinimidooxycarbonyl)pentyl ; R_3 , R_4 et R_7 représentent chacun l'hydrogène ; R_8 et R_9 représentent chacun un groupe sulfonate ; et m est égal à 2 ou

(ii) R_1 représente un groupe 5-(succinimidooxycarbonyl)pentyl ; R_2 représente un éthyl ; R_3 , R_4 et R_7 représentent chacun l'hydrogène ; R_8 et R_9 représentent chacun un groupe sulfonate ; et m est égal à 2, sont préférés.

25 La molécule porteuse possédant au moins un groupement amino, hydroxy, carboxy et/ou sulfhydryl est une biomolécule destinée d'une manière générale au diagnostic ou à la détection. Cette biomolécule pourra servir elle-même au marquage d'autres molécules, notamment de protéines. A titre d'exemple, on peut citer un anticorps, un antigène, une protéine, un peptide, un haptène, une lectine, l'avidine, la streptavidine, une toxine, un glucide, un oligosaccharide, un polysaccharide, un acide nucléique, une hormone, un médicament, un polymère, 30 une particule polymérique, du verre, une particule de verre ou une surface en verre ou en polymère.

Le procédé conforme à l'invention présente les avantages suivants :

- il évite la fonctionnalisation de cyclodextrines, et permet donc un gain de temps et d'argent ;

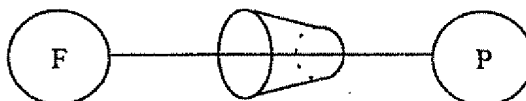
- il permet la stabilisation de façon irréversible du complexe d'inclusion entre le macrocycle soluble dans l'eau et le réactif fluorophore (les complexes d'inclusion ont habituellement des constantes d'équilibre faibles) ;

- il permet d'éviter le quenching de fluorescence des conjugués obtenus, sans intervenir sur la structure chimique du réactif fluorophore. En effet, les propriétés complexantes du macrocycle soluble dans l'eau permettent un éloignement *in situ* des réactifs fluorophores dont les distances intermoléculaires après conjugaison et purification du conjugué sont maintenues. Cet éloignement des réactifs fluorophores sur la molécule porteuse évite le phénomène d'agrégation et donc le quenching de fluorescence.

Selon un autre aspect, l'invention concerne également les conjugués fluorescents, obtenus par le procédé décrit précédemment.

Lorsque le complexe d'inclusion formé par le macrocycle soluble dans l'eau avec le réactif fluorophore et la molécule porteuse subsiste dans la structure finale du conjugué fluorescent, le réactif fluorophore est lié à la molécule porteuse de telle sorte que la partie hydrophobe du réactif fluorophore traverse le macrocycle soluble dans l'eau.

Si la molécule porteuse P et le réactif fluorophore F sont des groupements encombrants, le complexe réalisé sera stable et formera un rotaxane :



Le complexe obtenu est original car la cyclodextrine ne contient aucune liaison covalente avec le réactif fluorophore ou la molécule porteuse.

Comme indiqué précédemment, les conjugués fluorescents selon l'invention, notamment les complexes rotaxane, ne présentent pas de quenching de fluorescence en raison de l'éloignement des réactifs fluorophores sur la molécule porteuse.

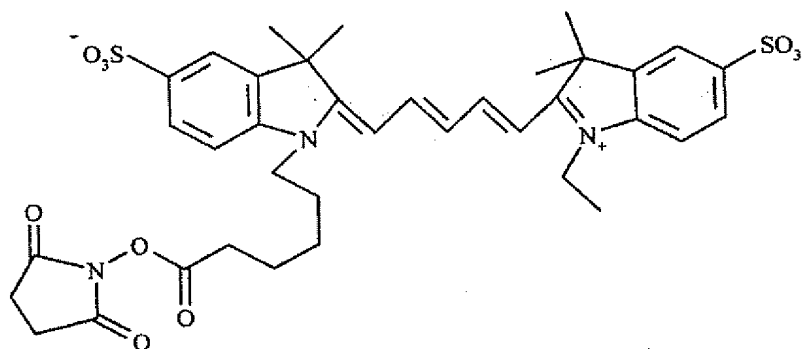
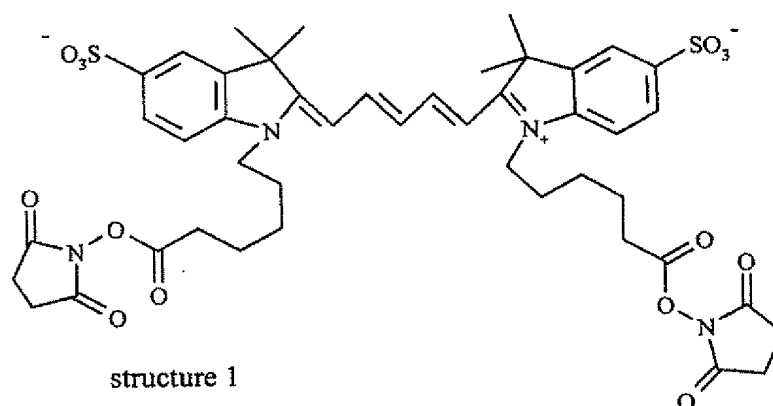
Les conjugués fluorescents selon l'invention se révèlent être d'excellents traceurs fluorescents.

Ainsi, selon un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation des conjugués fluorescents décrits ci-dessus comme traceurs fluorescents. Ces traceurs trouvent application par exemple en microscopie de fluorescence, en cytométrie de flux ou en immunodiagnostic en fluorescence, de préférence en microscopie de fluorescence ou en cytométrie de flux. Les conjugués fluorescents de l'invention peuvent également être utilisés pour la détection et/ou la détermination par fluorescence d'un analyte dans un milieu susceptible de le contenir.

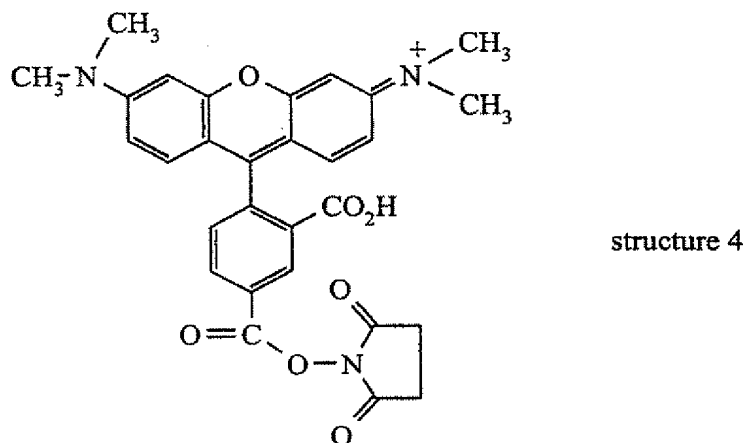
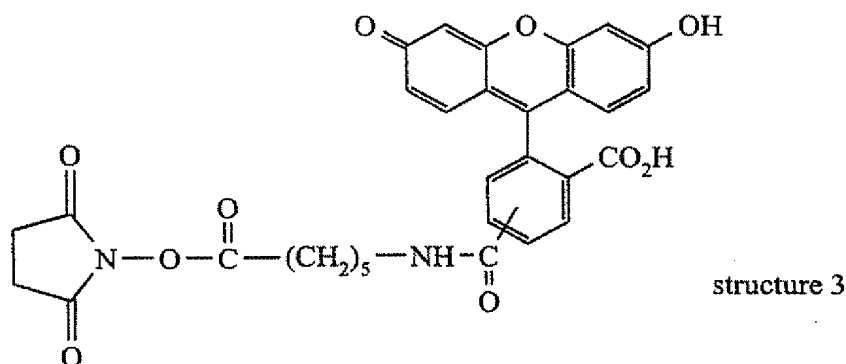
L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples ci-après, donnés à titre purement illustratifs.

10

EXEMPLE 1 - Fabrication des conjugués et analyse UV



15



1/ influence de la présence de la cyclodextrine

5 Conjugué N° 1

Un échantillon à 1 mg/ml d'anticorps marqueur tumoral du pancréas (référence : CA 19-9) en tampon carbonate 0,1M pH 9 est mélangé à température ambiante avec un excès molaire de 17 pour 1 de sulfoindodicarbocyanine de structure 1. Au bout de deux heures, l'échantillon est purifié par filtration sur gel

10 Séphadex®G25.

Le rapport molaire cyanine/anticorps final est de 3,90.

On observe des raies en UV à 650 et 605 nm. Le rapport DO_{650}/DO_{605} est de 1,62. L'apparition de la raie à 605 nm est signe d'une agrégation et d'un quenching de la molécule fluorescente.

15 Conjugué N° 2

On prépare une solution tampon carbonate 0,1 M pH 9 dans laquelle on dissout 40 % (m/v) d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine.

L'anticorps utilisé dans la préparation du conjugué n° 1 est dialysé dans ce tampon, auquel on ajoute une solution de sulfoindodicarbocyanine de structure 1.

Le rapport molaire initial cyanine/anticorps est de 17 pour 1.

Au bout de deux heures, l'échantillon est purifié sur gel Séphadex[®] G25.

On analyse par UV. On observe des raies à 650 et 605 nm.

On obtient un rapport molaire final cyanine/anticorps de 5,89 et un rapport
5 DO₆₅₀/DO₆₀₅ de 3,18.

Cet exemple montre bien que l'utilisation du complexe cyanine-cyclodextrine a permis d'éviter le phénomène d'agrégation constaté pour le conjugué N° 1.

10 *Conjugué N° 3*

Un anticorps anti-PSA (antigène spécifique de la prostate, de l'anglais "Prostate Specific Antigen", référence : PSA) est dialysé dans du tampon carbonate 0,1 M pH 9.

La solution à 0,85 mg/ml en anticorps est mise en contact avec la
15 sulfoindodicarbocyanine de structure 1. Le rapport molaire initial cyanine/anticorps est de 15 pour 1.

Deux heures après, on purifie sur gel Séphadex[®] G25.

Le produit est analysé par UV. On observe des raies à 650 et 605 nm. On obtient un rapport molaire final cyanine/anticorps de 4,54 et un rapport
20 DO₆₅₀/DO₆₀₅ de 1,40.

Conjugué N° 4

On procède comme décrit pour l'obtention du conjugué n° 3, excepté qu'on rajoute 15 % (m/v) d'hydroxypropyl-β-cyclodextrine dans le tampon carbonate 0,1 M pH 9.

25 Le conjugué analysé en UV donne les résultats suivants :

$$\text{DO}_{650}/\text{DO}_{605} = 2,60$$

$$\text{Rapport molaire final cyanine/anticorps} = 0,96$$

En comparant au conjugué N° 3 on note une forte augmentation du rapport DO₆₅₀/DO₆₀₅. Cela traduit une réduction importante de l'agrégation et un
30 quenching sensiblement diminué.

Conjugués N° 5 et 6

On opère respectivement comme pour les conjugués N° 1 et 2, en utilisant un anticorps anti-hormone chorionique gonadotrope à une concentration de 3 mg/ml et, comme marqueur fluorescent, la fluorescéine de structure 3. Le pH de
35 couplage est 9 et le temps d'incubation de 30 mn.

On observe en UV des raies à 497 et 462 nm.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 1 :

Tableau 1

N° conjugué	rapport molaire initial fluorescéine/ anticorps	rapport molaire final fluorescéine/ anticorps	% cyclodextrine	DO ₄₉₇ /DO ₄₆₂
5	4	2,1	0	2
6	10	2,4	40	2,3

La présence de cyclodextrine, pendant le couplage du dérivé fluorescéine, a permis d'augmenter le rapport des densités optiques DO₄₉₇/DO₄₆₂, et donc de diminuer le phénomène d'aggrégation. (Le spectre UV du dérivé fluorescéine seul présente un rapport de raies égal à 2,4).

Le conjugué N° 6 est plus performant en terme de fluorescence.

2/ Influence de la nature de la cyclodextrine

Différentes cyclodextrines (conjugués 7 à 12) sont testées afin d'apprécier l'influence de la nature de la cyclodextrine sur l'apparition des raies parasites : 605 nm pour la cyanine et 522 nm pour la rhodamine. Deux conjugués témoins (conjugués N°13 et 14) ne contenant pas de cyclodextrine sont aussi testés à titre de comparaison.

Les conjugués 7 à 10 et 13 sont obtenus en suivant le mode opératoire décrit pour l'obtention du conjugué n° 2, en appliquant les conditions expérimentales suivantes :

nature de l'anticorps : anticorps anti-PSA

concentration de l'anticorps : 0,75 mg/ml

concentration de la cyclodextrine dans le tampon carbonate 0,1 M pH 9 :

13 (ou 0) % (m/v)

rapport molaire initial cyanine/anticorps : 17 pour 1

temps d'incubation : 2 h

Après deux heures, la cyanine libre est épuisée sur cône amicon par centrifugation pendant 5 min. à 4000 g. On purifie ensuite sur gel Séphadex[®] G25.

Les conjugués 11, 12 et 14 sont obtenus en suivant le mode opératoire décrit pour l'obtention du conjugué N° 2, en appliquant les conditions expérimentales suivantes :

marqueur fluorescent : rhodamine de structure 4

30 nature de l'anticorps : anticorps anti-hormone chorionique gonadotrope

concentration de l'anticorps : 4 mg/ml

concentration de la cyclodextrine dans le tampon carbonate 0,1 M pH 9 :

10 (ou 0) % (m/v)

rapport molaire initial rhodamine/anticorps : 17 pour 1

5 temps d'incubation : 30 mn.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 2 :

Tableau 2

	conjugué N°7 hydroxypropyl- α - cyclodextrine	conjugué N°8 hydroxypropyl- γ - cyclodextrine	conjugué N°9 hydroxypropyl- β - cyclodextrine	conjugué N°10 diméthyl- β - cyclodextrine	conjugué N° 11 hydroxypropyl- β -cyclodextrine	conjugué N° 12 diméthyl- β - cyclodextrine	conjugué N° 13 -	conjugué N° 14 -
rapport molaire final cyanine (rhodamine)/ anticorps	1,8	1,8	1,2	2,0	1	1,2	2,6	1,3
DO ₆₅₀ /DO ₆₀₅	1,9	2,0	2,6	2,55	2,4*	1,54*	1,45	1,37*
* DO ₅₃₃ /DO ₅₂₂								
Fluorophore	cyanine	cyanine	cyanine	cyanine	rhodamine	rhodamine	cyanine	rhodamine

Les fortes valeurs du rapport DO_{650}/DO_{605} (2,6 et 2,55) obtenues avec les deux β -cyclodextrines montrent leur capacité à désagréger la cyanine de structure 1. Ces valeurs sont aussi le reflet de constantes de stabilité élevées.

- 5 Pour le dérivé rhodamine de structure 4, l'utilisation d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine permet d'augmenter de façon sensible le rapport des densités optiques et de diminuer en conséquence l'effet d'agrégation.

3/ Influence de la concentration de couplage

- 10 Les concentrations sont un élément important dans les phénomènes d'agrégation.

Différentes concentrations en anticorps sont donc testées.

Les conjugués sont obtenus en suivant le mode opératoire décrit pour l'obtention du conjugué n° 2, en appliquant les conditions expérimentales suivantes :

- 15 nature de l'anticorps : anticorps anti-PSA
 rapport molaire initial cyanine/anticorps : 17 pour 1
 temps de couplage : 2 h
 nature de la cyclodextrine : diméthyl- β -cyclodextrine
 concentration en cyclodextrine dans le tampon carbonate 0,1 M pH 9 :
 20 13 % (m/v)

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 3.

Tableau 3

	Conjugué N°15	Conjugué N°16	Conjugué N°17
concentration en anticorps (mg/ml)	0,75	1,5	3,0
rapport molaire final cyanine/anticorps	1,2	1,8	2,3
DO_{650}/DO_{605}	2,7	2,6	2,45

- 25 Avec une concentration de 3 mg/ml on obtient un rapport molaire final cyanine/anticorps élevé (2,3) avec un bon rapport DO_{650}/DO_{605} (2,45).

Ces valeurs sont à comparer à celles du Tableau 2 dans lequel un rapport molaire final cyanine/anticorps de 2,6 est associé à un rapport DO_{650}/DO_{605} faible (1,45).

Le procédé selon l'invention permet donc d'augmenter le rapport molaire final cyanine/anticorps tout en conservant un bon rapport DO₆₅₀/DO₆₀₅.

Cela n'est pas possible sans l'utilisation de cyclodextrines.

4/ Influence de la concentration en cyclodextrine

- 5 Les conjugués sont obtenus en suivant le mode opératoire décrit pour l'obtention du conjugué n° 2, en appliquant les conditions expérimentales suivantes :

nature de l'anticorps : anticorps anti-TSH (hormone thyroïdienne, de l'anglais "Thyroid-Stimulating Hormone", référence : TSH)

- 10 rapport molaire initial cyanine (de structure 2)/anticorps : 17 pour 1

temps de couplage : 1 h

nature de la cyclodextrine : hydroxypropyl- β -cyclodextrine

Après épuisement sur cône amicon, le conjugué est purifié sur gel Séphadex ® G25.

- 15 Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 4.

Tableau 4

	Conjugué N°18	Conjugué N°19	Conjugué N°20
concentration en cyclodextrine (m/v)	5 %	14 %	32 %
rapport molaire final cyanine/anticorps	3,9	2,74	2,45
DO ₆₅₀ /DO ₆₀₅	1,7	2,2	2,6

- 20 On voit nettement dans le Tableau 4, l'influence du pourcentage de cyclodextrine.

La loi d'action de masse est déplacée dans le sens de formation du complexe par augmentation de la concentration de cyclodextrine.

EXEMPLE 2 : Performances de fluorescence des conjugués

- 25 L'analyte choisi est le PSA.

Les mesures sont effectuées sur un fluorimètre LS50 de PERKIN-ELMER (λ_{max} d'émission = 660 nm).

Deux milieux sont testés :

- milieu 1 : tampon phosphate 0,1 M pH 7

- milieu 2 : milieu 1 + 1/3 sérum veau nouveau né

Le conjugué N° 21 a été fabriqué selon le mode opératoire décrit pour l'obtention du conjugué n° 2.

Les conjugués N° 22 et 23 ont été fabriqués selon le mode opératoire décrit
5 pour l'obtention du conjugué n° 1 mais avec des concentrations d'anticorps respectivement de 0,1 et 0,3 mg/ml.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 5.

TABLEAU 5

	unités de fluorescence (a)					rapport molaire final cyanine/anticorps	DO ₆₅₀ / DO ₆₀₅
	milieu 1		milieu 2				
	excitation 600 nm	excitation 650 nm	excitation 600nm	excitation 650 nm			
Conjugué n° 21	1	1	0,97	1,1	0,85	2,94	
Conjugué n° 22	0,12	0,26	0,13	0,28	1,0	2,5	
Conjugué n° 23	0,4	0,69	0,44	0,74	3,0	2,0	

(a) les unités de fluorescence sont exprimées :

- par unité de densité optique
- en relatif par rapport au conjugué N° 21 dans le milieu 1.

L'examen du tableau 5 montre tout l'intérêt du procédé conforme à l'invention :

- dans tous les cas le conjugué fabriqué avec le complexe cyanine + cyclodextrine (conjugué N° 21) est supérieur en fluorescence aux conjugués fabriqués avec la cyanine sans cyclodextrine (conjugués N° 22 et 23).
- il n'y a pas en présence de sérum de quenching des conjugués fabriqués.

EXEMPLE 3 : Performance dans un immunoessai

L'immunoessai est conduit selon la méthode homogène décrite par G. Mathis dans Clin. Chem., Vol 39, n°9, 1993.

Les performances des conjugués 21, 22 et 23 ont comparées entre elles, en utilisant des échantillons standards à différentes concentrations d'antigène.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 6 :

15

Tableau 6

	conjugué n° 21	conjugué n° 22	conjugué n° 23
échantillon N° 1 0,53 ng/ml	113	67	86
échantillon N° 2 5,3 ng/ml	2380	1378	1885
échantillon N° 3 31 ng/ml	4175	2289	3323

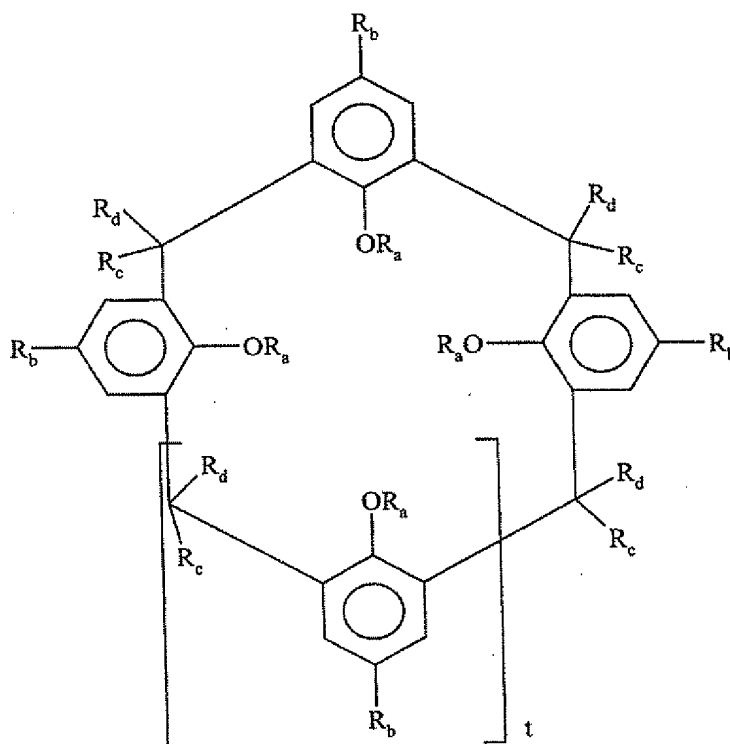
Les grandeurs sont exprimées en unités de fluorescence

Ce tableau montre bien que le gain de fluorescence observé sur le conjugué 21 par rapport aux conjugués 22 et 23 (Tableau 5) se répercute également sur l'immunoessai.

Les conjugués fabriqués avec une cyclodextrine permettent donc d'augmenter la sensibilité des dosages dans un immunoessai.

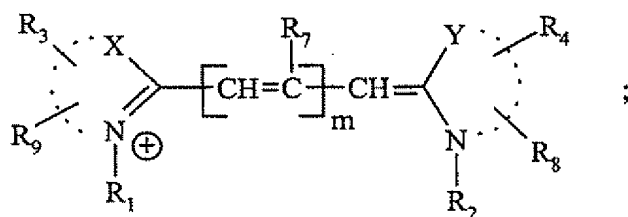
REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention d'un conjugué fluorescent entre une molécule porteuse possédant au moins un groupement amino, hydroxy, carboxy et/ou sulfhydryl et un réactif fluorophore possédant au moins un groupement fonctionnel susceptible de réagir avec le(s)dit(s) groupe(s) amino, hydroxy, carboxy et/ou sulfhydryl, qui consiste à mettre en présence ladite molécule porteuse et ledit réactif fluorophore avec une solution aqueuse d'un macrocycle soluble dans l'eau contenant de 1 à 40 % (m/v) dudit macrocycle.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le macrocycle soluble dans l'eau est choisi parmi une cyclodextrine éventuellement substituée ou un calixarène substitué par des groupements hydrophiles.
3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel le macrocycle soluble dans l'eau est une cyclodextrine choisie parmi l' α -cyclodextrine,
15 la β -cyclodextrine, la γ -cyclodextrine, l'hydroxypropyl- α -cyclodextrine, l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine, l'hydroxypropyl- γ -cyclodextrine, l'hydroxyéthyl- α -cyclodextrine, l'hydroxyéthyl- β -cyclodextrine, l'hydroxy-éthyl- γ -cyclodextrine, ou la 2,6-di-O-méthyl-heptakis- β -cyclodextrine.
4. Procédé selon la revendication 2, dans lequel le macrocycle soluble dans
20 l'eau est un calixarène de structure

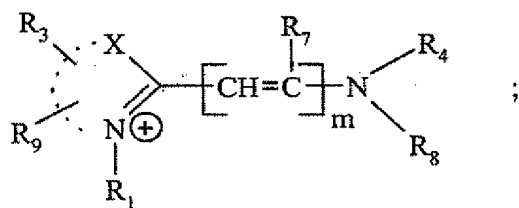


dans laquelle :

- R_a et R_b représentent chacun un groupement hydrophile choisi parmi H, $(CH_2)_pCO_2H$, $(CH_2)_pOH$, $(CH_2)_pNH_2$, $(CH_2)_pSO_3H$ ou $(CH_2)_pN^+R_cR_dR_e$;
 - 5 - R_c , R_d et R_e représentent chacun l'hydrogène ou un (C_1-C_3) alkyle ;
 - p varie de 0 à 4 pour R_b et de 1 à 4 pour R_a ; et
 - t varie de 1 à 5.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel la solution aqueuse de macrocycle contient de 10 à 40 % (m/v) de macrocycle.
- 10 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel le réactif fluorophore est un chromophore à un ou plusieurs noyaux aromatiques possédant un coefficient d'extinction moléculaire élevé.
7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel le réactif fluorophore est choisi parmi
- 15 * une cyanine de structure

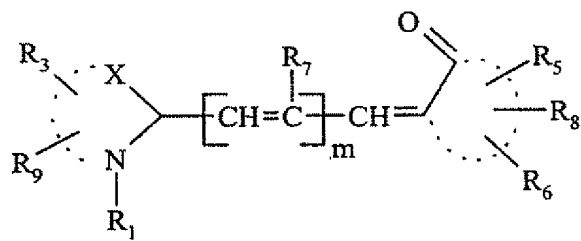


* une hémicyanine de structure



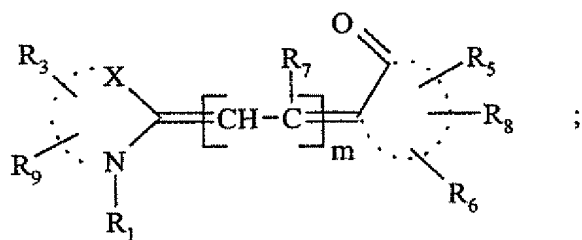
5

* une mérocyanine de structure

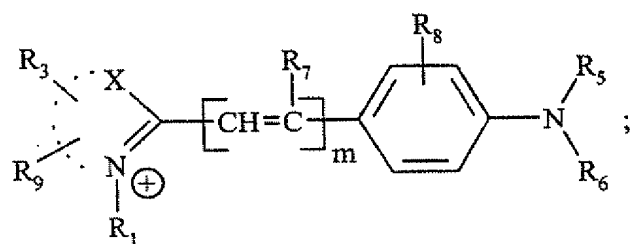


10

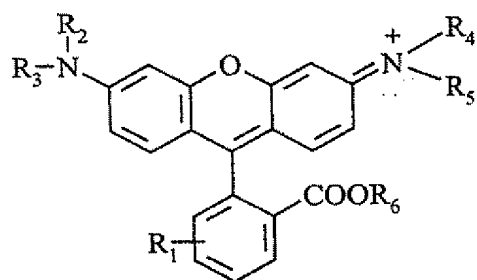
ou



15 * un styryl de structure

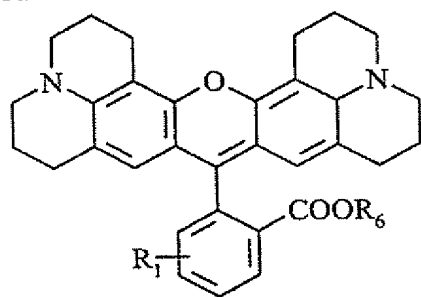


* une rhodamine de structure :



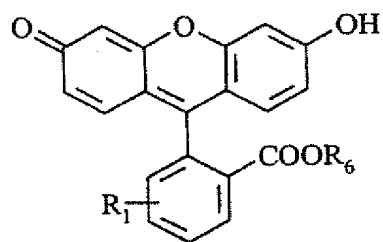
5

ou



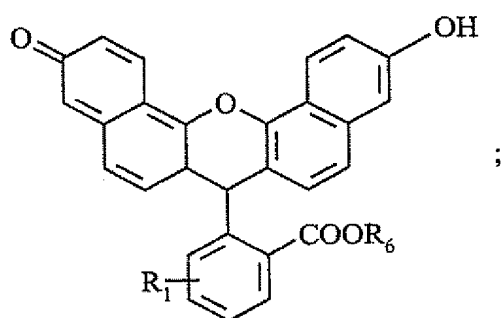
* une fluorescéine de structure :

10



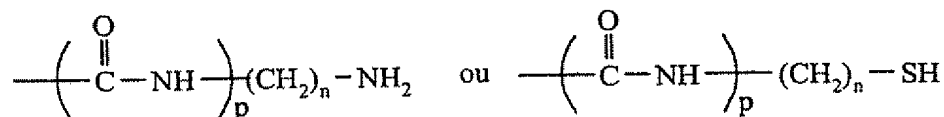
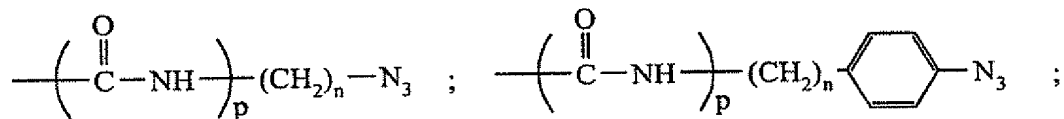
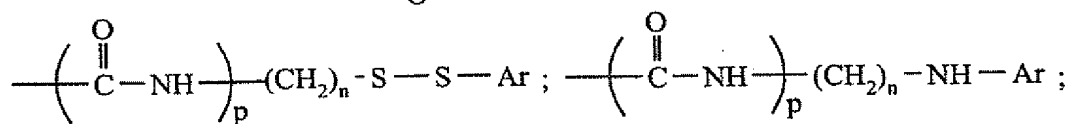
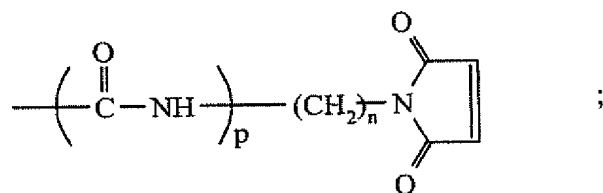
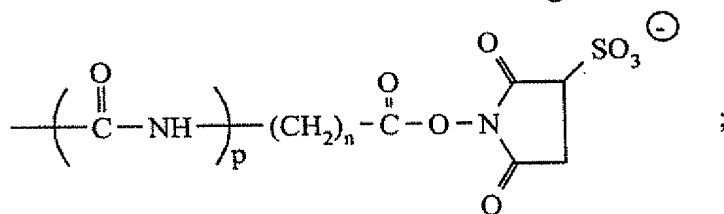
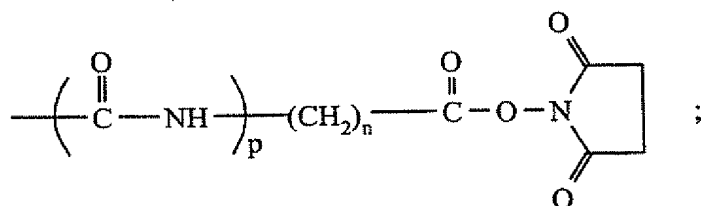
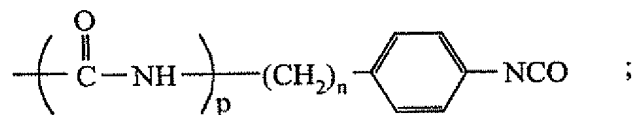
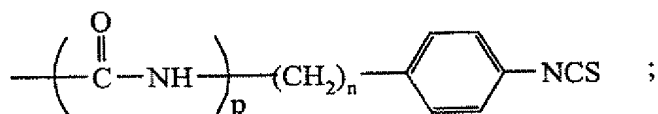
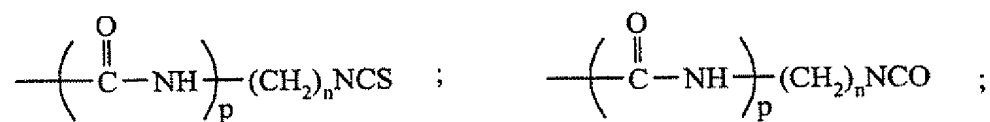
; ou

* une naphthofluorescéine de structure :



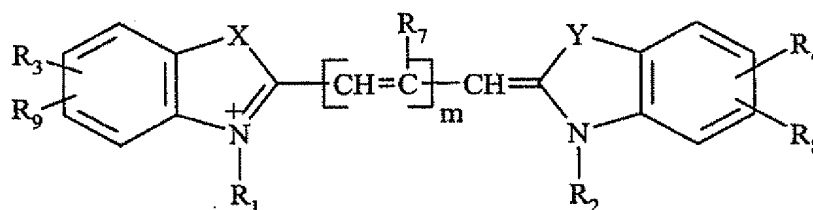
dans lesquelles structures :

- les lignes en pointillé représentent chacune les atomes de carbone nécessaires pour former 1 à 3 cycles fusionnés, les groupes R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_8 et R_9 étant attachés à ces cycles ;
- X et Y représentent chacun N, $\text{C}=\text{O}$, O, S ou $\text{C}(\text{CH}_3)_2$;
- m vaut 1, 2, 3 ou 4 ;
- au moins un des groupes R_1 à R_7 est capable de réagir avec un groupement amino, hydroxy, carboxy et/ou sulfhydryl et est choisi parmi



où n varie de 0 à 8 et p est égal à 0 ou 1, et Ar est un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons comprenant 1 à 3 hétéroatomes, éventuellement substitué par un atome d'halogène, ceux des groupes R_1 à R_7 ne représentant pas une des entités réactives ci-dessus étant choisis parmi l'hydrogène ou un groupe $-(CH_2)_r-Z$ dans lequel r varie de 0 à 4 et Z représente un groupe CH_3 , SO_3H , OH ou $N^+R_1R_2R_3$ dans lequel R_1 , R_2 et R_3 sont tels que définis ci-dessus, et au moins un des groupes R_8 et R_9 représente un groupe SO_3^- ou SO_3H , l'autre groupe représentant l'hydrogène ou un groupe SO_3^- ou SO_3H .

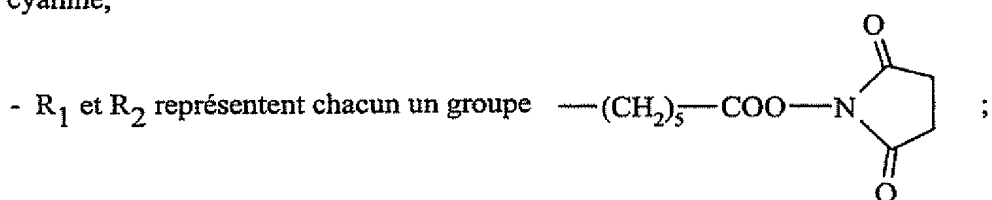
8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le réactif fluorophore est une cyanine de structure :



dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_7 , R_8 et R_9 sont tels que définis dans la revendication 7.

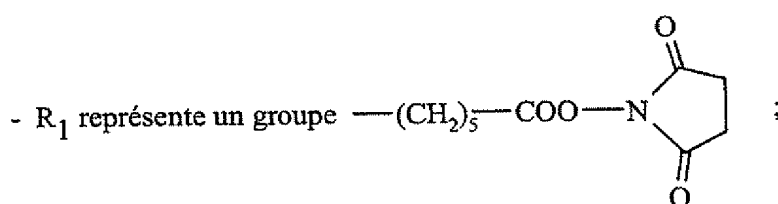
9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel X et Y représentent chacun un groupe $C(CH_3)_2$ dans la structure de la cyanine.

10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel dans la structure de la cyanine,



- R_3 , R_4 et R_7 représentent chacun l'hydrogène ;
 - R_8 et R_9 représentent chacun un groupe SO_3^- ; et
 - m est égal à 2.

11. Procédé selon la revendication 9, dans lequel dans la structure de la cyanine,



- R₂ représente un éthyl ;
 - R₃, R₄ et R₇ représentent chacun l'hydrogène ;
 - R₈ et R₉ représentent chacun un groupe SO₃⁻ ; et
- 5 - m est égal à 2.
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel la molécule porteuse est un anticorps, un antigène, une protéine, un peptide, un haptène, une lectine, l'avidine, la streptavidine, une toxine, un glucide, un oligosaccharide, un polysaccharide, un acide nucléique, une hormone, un
- 10 médicament, un polymère, une particule polymérique, du verre, une particule de verre ou une surface en verre ou en polymère.
13. Conjugué fluorescent, obtenu par le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 12.
14. Conjugué fluorescent selon la revendication 13, issu de l'accrochage du
- 15 complexe d'inclusion formé par le macrocycle soluble dans l'eau et le réactif fluorophore sur la molécule porteuse.
15. Conjugué fluorescent selon la revendication 14, dans lequel le complexe d'inclusion subsiste dans la structure finale du conjugué et forme un rotaxane stable.
- 20 16. Conjugué fluorescent selon la revendication 13, issu de l'accrochage du complexe d'inclusion formé par le macrocycle soluble dans l'eau et la molécule porteuse sur le réactif fluorophore.
17. Conjugué fluorescent selon la revendication 16, dans lequel le complexe d'inclusion subsiste dans la structure finale du conjugué et forme un rotaxane
- 25 stable.
18. Utilisation d'un conjugué fluorescent selon l'une quelconque des revendications 13 à 17 comme traceur fluorescent.
19. Utilisation selon la revendication 18, pour la détection et/ou la détermination par fluorescence d'un analyte dans un milieu susceptible de le
- 30 contenir.
20. Utilisation selon la revendication 18, en microscopie de fluorescence ou en cytométrie de flux.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/02288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/533 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 068 227 A (WEINSHENKER NED M) 26 November 1991 see column 1, line 65 - column 2, line 42; claims	1-20
A	WO 91 05605 A (KOSAK KENNETH M) 2 May 1991 see page 24, paragraph 2 - page 27, paragraph 2; claims	1-20
A	WO 91 02040 A (KOSAK KENNETH M) 21 February 1991 cited in the application see page 25, paragraph 2 - page 29, paragraph 1; claims	1-20
A	WO 95 02700 A (ABBOTT LAB) 26 January 1995 see page 18, line 7 - page 19, line 21; claims 1,7-13,21-26	1-20

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 March 1998

Date of mailing of the international search report

11/03/1998

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ginoux, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr :al Application No
PCT/FR 97/02288

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 5 268 486 A (WAGGONER ALAN S ET AL) 7 December 1993 cited in the application see column 9, line 26 - column 12, line 32; claims</p> <p>-----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/02288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5068227 A	26-11-91	NONE	
WO 9105605 A	02-05-91	NONE	
WO 9102040 A	21-02-91	NONE	
WO 9502700 A	26-01-95	AU 7331794 A CA 2172999 A EP 0708837 A JP 9500411 T US 5661040 A	13-02-95 26-01-95 01-05-96 14-01-97 26-08-97
US 5268486 A	07-12-93	US 5486616 A US 5569766 A DE 3912046 A JP 2191674 A US 5569587 A US 5627027 A	23-01-96 29-10-96 15-03-90 27-07-90 29-10-96 06-05-97

Dem · Internationale No
PCT/FR 97/02288

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CtB

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 GOIN

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 068 227 A (WEINSHENKER NED M) 26 novembre 1991 voir colonne 1, ligne 65 - colonne 2, ligne 42; revendications	1-20
A	WO 91 05605 A (KOSAK KENNETH M) 2 mai 1991 voir page 24, alinéa 2 - page 27, alinéa 2; revendications	1-20
A	WO 91 02040 A (KOSAK KENNETH M) 21 février 1991 cité dans la demande voir page 25, alinéa 2 - page 29, alinéa 1; revendications	1-20
A	WO 95 02700 A (ABBOTT LAB) 26 janvier 1995 voir page 18, ligne 7 - page 19, ligne 21; revendications 1, 7-13, 21-26	1-20

-/--

X Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 mars 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/03/1998

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ginoux, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem internationale No

PCT/FR 97/02288

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>US 5 268 486 A (WAGGONER ALAN S ET AL) 7 décembre 1993 cité dans la demande voir colonne 9, ligne 26 - colonne 12, ligne 32; revendications -----</p>	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 97/02288

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5068227 A	26-11-91	AUCUN	
WO 9105605 A	02-05-91	AUCUN	
WO 9102040 A	21-02-91	AUCUN	
WO 9502700 A	26-01-95	AU 7331794 A CA 2172999 A EP 0708837 A JP 9500411 T US 5661040 A	13-02-95 26-01-95 01-05-96 14-01-97 26-08-97
US 5268486 A	07-12-93	US 5486616 A US 5569766 A DE 3912046 A JP 2191674 A US 5569587 A US 5627027 A	23-01-96 29-10-96 15-03-90 27-07-90 29-10-96 06-05-97

